云 南 植 物 研 究 3(4):441—448,1981
Acta Botanica Yunnanica

植物冠瘿的诱导培养和植株再生

王 钧 万石双 李 英

(中国科学院昆明植物研究所)

摘 要

用根癌土壤杆菌*S*-1*、702和*C*-58从向日葵胚轴、烟草茎和茎髓，胡萝卜根及马铃薯块茎诱发并建立了冠瘿株系。观察了它们的生长，畸胎瘤发生。在诱发后数月内有些冠瘿株发生明显变化。向日葵冠瘿株在诱发七个月后外形和生长速度发生了变化。由*S*-1菌株诱发的马铃薯块茎畸胎瘤发生在诱发初期，但702菌株诱发的两株烟草无组织冠瘿株在诱发后155天左右才出现畸胎瘤，不同菌株诱发的两个烟草冠瘿株对植物激素的反应不同。获得了分化程度不同的一组畸瘤胎。用植物激素研究了冠瘿瘤的逆转。两个胡萝卜和两个烟草冠瘿株系分别得到再生植株。所有冠瘿株包括畸胎瘤产nopaline，由烟草畸胎瘤的再生植株也测出了nopaline。

冠瘿是土壤杆菌属*Agrobacterium*的一些细菌诱发的植物肿瘤。这些细菌含致癌的Ti质粒[1]。Ti质粒是目前仅知的能在植物中持久保存和表达的外源质粒DNA。冠瘿实质上是土壤杆菌通过Ti质粒对植物进行基因工程的产物[2，3]，植物细胞中持久存留的只是Ti质粒的片段，这种片段称为T-DNA[4]。利用T-DNA作探针对探索植物基因结构，复制和表达的调控，探索植物器官分化，肿瘤机理等理论可能有价值。经过改造的Ti质粒有可能当选为植物遗传工程的载体。

我们分离、收集、鉴定了一些致癌土壤杆菌菌株[5]。用它们诱发了一些植物冠瘿，建成了向日葵、烟草、胡萝卜、马铃薯的无菌冠瘿株系。初步对这些株系进行了观察，诱发了分化。现将结果报导如下：

材料和方法

冠瘿诱发

菌株：根癌土壤杆菌生物Ⅰ型菌株*S*-1、*C*-58。根癌土壤杆菌生物Ⅱ型菌株702*。

细菌培养和发酵条件：斜面培养基用1%乳糖、0.5%酵母膏、1%碳酸钙、1.5%琼脂。发酵培养基为0.5%蔗糖、0.1%酵母膏、0.5%蛋白胨、0.3%牛肉膏。经接种斜面菌种后，28°C摇床培养18—24小时。

烟草和向日葵植株冠瘿诱发：烟草品种红花大金元、高约50公分的健壮植株幼茎茎

* *S*-1吴敏贤赠送，702林宁夫赠送，*C*-58是美国菌株。

节、发芽7—10天向日葵苗的胚轴，用注射器穿刺接种发酵菌液，烟茎在15—20天，向日葵在7—10天后即可见冠瘿。

烟草茎髓、胡萝卜根、马铃薯块茎冠瘿诱发：品种为红花大金元的烟株，取手指粗的茎段、市场上买的黄胡萝卜和马铃薯块茎，取新挖出不久的，水洗去土，酒精擦净，浸75—90%酒精中约一分钟，用酒精灯点燃约十几秒钟，入无菌培养皿，无菌条件下剥取烟髓，切成一厘米长切段；用打孔器切成直茎一厘米的胡萝卜根和马铃薯块茎圆条，切成厚4毫米以上的碟片。分别将它们置于含1%琼脂的培养皿中，滴加发酵菌液，用胶带纸封闭固皿缘，25°C培养。烟髓在15—30天内、胡萝卜碟片在6—30天、马铃薯碟片在10—20天内出现冠瘿。

在诱发冠瘿同时、用同株或同茎髓、根、块茎分别建立愈伤组织系。烟草和向日葵愈伤组织培养基为MS基本培养基[6]＋2毫克/升吲哚乙酸＋0.1毫克/升激动素。胡萝卜愈伤组织培养基为B_5基本培养基[7]＋0.2毫克/升，2,4－D＋0.1毫克/升激动素。马铃薯愈伤组织培养基为MS大量＋MS微量＋Nitsch有机成份＋2.5%蔗糖。所有培养基含0.8%琼脂。

无菌冠瘿系建立

烟茎髓、胡萝卜根、马铃薯块茎上的肿瘤长到直径2—4毫米后，切取肿瘤；烟株和向日葵株上的肿瘤长到直径约1厘米后，用上述常规方法消毒，无菌条件下切除外部组织，取离穿刺孔远的小块；将它们分别放入含有经过滤灭菌的万古霉素、羧苄青霉素、硫酸链霉素各200ppm或四环素200ppm的下列培养基中：烟草和向日葵用MS基本培养基；胡萝卜用B_5基本培养基；马铃薯用MS基本培养基，但用Nitsch的有机成份。25°C培养，每日照光10小时。每月转接一次，经1—3次转接，移入无抗菌素培养基，即得无菌冠瘿系。

冠瘿组织分化诱导

在上述培养条件下，胡萝卜用B_5基本培养基＋0.5毫克/升2,4－D＋0.1—0.2毫克/升激动素的培养基，培养一或数月，再转回B_5基本培养基。烟草用基本培养基＋2毫克/升激动素＋1毫克/升吲哚乙酸或MS基本培养基＋2毫克/升激动素，培养一或几月。待长芽后，转入MS基本培养基或MS基本培养基＋0.5—1.0毫克/升吲哚乙酸或MS基本培养基＋0.5毫克/升萘乙酸钠的培养基，促进生根。

冠瘿组织 nopaline 的定性鉴别[8]

冠瘿组织，每克鲜重加1毫升95%乙醇，水浴中研磨，5°C下5000rpm离心10分钟，取上清液点样在Whatman 3 MM层析滤纸上，以吡啶－醋酸－水(100：8：25000体积比) pH 6.1为电泳液，4°C条件下，1600伏（40伏/厘米）电泳一小时，80°C烘干去溶剂，冷后，用坂口试剂显色，nopaline泳向阳极，显桃红色。

试 验 结 果

冠瘿诱发与菌株及植物组织特征的联系

观察了影响胡萝卜根碟片、马铃薯块茎碟片、烟草髓冠瘿诱发的因子。除碟片大小、

厚度、切取碟片部位、极性、个体差异、诱导温度等和文献相似外[9, 10]，菌株和植物种类的配合很重要。

对胡萝卜根碟片来说，最敏感的菌株是702，它是生物Ⅱ型菌株，虽然发酵菌液浓度比另两株低很多，但它诱发时肿瘤出得最早，第六天就出现，而C-58要20天左右才出肿瘤。另两个菌株不诱发肿瘤或只诱发很少的肿瘤，用它却能诱发出较多的肿瘤。容易产生疮伤愈合组织的碟片一般容易诱发产生冠瘿。碟片上瘤或集中在形成层周围，数少而体大；或较分散，以形成层、次生韧皮部较密集，数多而瘤体小。冠瘿这种分布看来与菌株有关，但也有例外，而这种分布和致癌能力，肿瘤出现先后未必有关。

烟髓用702株诱发14—18天出现肿瘤，而用S-1株要20多天后才出少数肿瘤。我们曾用花烟草（*Nicotiana alata*）茎髓，用这些菌株，很难诱发成功。

马铃薯块茎用这三株菌，仅S-1株容易诱发出冠瘿，但如改用茎节，芽尖诱发，也难出肿瘤。

利用抗菌素建立无菌冠瘿系

用能杀土壤杆菌而不明显影响冠瘿生命力的抗菌素加在培养基中，经几代转移，就可建立无菌冠瘿系。因为细菌往往发生突变，对某种抗菌素产生抗性，最好用多种不同功能的抗菌素混合物。采用万古霉素、羧苄青霉素和硫酸链霉素各200ppm的配方[11]时，偶尔还会出现突变或染菌情况，此时我们换用含200ppm四环素的培养基，达到了控制目的。

Sobota认为四环素杀菌能力比以上三种抗菌素都强（最低杀菌浓度为62.5微克/毫升）而且对胡萝卜肿瘤细胞的核酸合成抑制很微[12]。但我们注意到在200ppm时，像上面三种抗菌素一样，它只能杀灭低浓度菌液。肿瘤组织在这种抗菌素培养基上也要转1—3次后才能无菌。而在200ppm浓度下，四环素比上述三种抗菌素混合物对肿瘤生长抑制稍高，去抗菌素后，用四环素处理的材料的生长，几乎立即恢复到未加它的无菌冠瘿水平，而用三种抗菌素混合物的恢复较慢。（见表1和图Ⅰ—1）

冠瘿的生长与原菌株及宿主关系，培养过程中生长特性的变化

无菌冠瘿系生长特点与原菌株及宿主都有关系。菌株702诱发的向日葵和胡萝卜的

表1.　不同抗菌素对烟草和胡萝卜冠瘿生长的影响

处　理	烟草冠瘿				胡萝卜冠瘿			
	鲜重		干重		鲜重		干重	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
对　照	757	100	56.5	100	1928	100	114	100
万古霉素＋羧苄青霉素＋链霉素	223	29.4	20.4	35.0	293	15.2	33.9	29.7
四环素	130	17.2	14.0	24.8	312	16.2	32.0	28.6

＊　每种抗菌素都用200ppm。

冠瘿生长速度一直比其它菌株诱发的慢得多，但在烟草上它诱发获得的冠瘿系生长速度和菌株$S-1$的一样快。$S-1$株诱发的其它三种植物的冠瘿长得快，但$S-1$株诱发的马铃薯冠瘿长得很慢。

虽然菌株702和$S-1$诱发得到的烟髓无组织结构的冠瘿系生长选度和外观没有多少区别，但二者对MS基本培养基＋2毫克/升萘乙酸钠＋0.2毫克/升6-苄基嘌呤的反应不同，前者组织变得疏松粗糙，生长变快，后者对外源激素反应不明显（见图Ⅰ—2）。

几种不同菌株诱发的向日葵冠瘿不同时期相对生长速度是变化的。在整株上702株、$S-1$株诱发的冠瘿长得比$C-58$诱发的大得多。但切下建成无菌系后，702株诱发的冠瘿生长一直很缓慢。开头一段时间，$S-1$株诱发的冠瘿长得比$C-58$的快些，此时各瘤株色淡黄，外形较光滑。但在诱发七个月后，$C-58$株诱发的冠瘿株外形变得粗糙，颜色也灰白，生长速度超过了$S-1$株诱发的冠瘿株系（图Ⅰ—3）。

马铃薯和烟草畸胎瘤的发生

一般讲，nopaline型菌株容易诱发畸胎瘤，但畸胎瘤产生不仅和菌株有关，也和植物有关。我们所用的都是nopaline型菌株，它们所诱发的烟草、向日葵、胡萝卜、马铃薯冠瘿系均近一年了。702株只诱发烟茎烟髓产生畸胎瘤。$S-1$只诱发马铃薯产生了畸胎瘤。至今$C-58$未使任何一种植物产畸胎瘤。

$S-1$诱发的马铃薯块茎上的畸胎是在诱发初期产生的（图Ⅰ—4）。但702株对烟茎和烟髓诱发产生的冠瘿，最初都是不分化的，畸胎瘤都是在各自诱发后155天左右才从不分化的冠瘿组织局部产生出来（图Ⅰ—5）。

从烟茎的一个冠瘿系中诱发出的畸胎瘤中我们分出了几种类型。有一种含有生长快的不分化组织和生长慢的畸形叶，这种叶小而不完全，叶肉少而叶柄大，叶脉不明显。另一种不分化的组织较少，畸形芽长得多而快，叶形稍大、扁圆、叶和茎节短，形如莲座，还有一种不分化组织很少，畸形芽长得更快，叶形长，叶脉明显，茎节能伸长，但缺乏顶端优势，在茎基部和茎节长出很多枝芽（见图Ⅰ—6）。把这些畸形叶芽取下培养仍长出具原来特色的畸胎瘤。这样，我们得到了从不分化的组织到不同程度分化的畸胎瘤谱系。

胡萝卜和烟草冠瘿的再生植株的诱导

冠瘿是去分化的肿瘤组织，曾有人报导使烟草[13, 14]和拟南芥菜[15]的冠瘿分化，长出植株。我们用胡萝卜、烟草冠瘿进行初试也得到再生植株。

胡萝卜：在诱发后半年到十个月之间，把冠瘿组织从B_5基本培养基转到带2,4-D和少量激动素的培养基一个月后再转回B_5基本培养基上，我们先后对由$C-58$诱发的三株冠瘿和$S-1$诱发的三株冠瘿诱导分化。结果$C-58$诱发的三株都发生了分化，而$S-1$诱发的都没有发生分化。两株得自$C-58$的冠瘿在诱发半年后诱导分化，分别在诱导后35天和三个半月后得到再生植株（见图Ⅰ—7、8）；另一株诱发后十个月才诱导的，两个月后也已有分化迹象。

和对照的愈伤组织分化不同，几十块组织中只有几块的局部产生分化，而其它部分即使经3—5次转接，即3—5个月长在诱导培养基上后，转到不带激素的培养基上，也不分化。

图Ⅰ 1.用含抗菌素（每种200ppm）培养基处理一个月，再在正常培养基上生长一个月的冠瘿。上：烟草，下：胡萝卜。左：万古霉素＋羧苄青霉素＋硫酸链霉素，中：四环素，右：对照。2. 根癌土壤杆菌菌株S-1、702和C-58诱发的向日葵冠瘿，示C-58菌株诱发出的冠瘿外形和生长速度发生了变化。左：S-1诱发的冠瘿，中：C-58诱发的冠瘿，右：702诱发的冠瘿。3. 含2毫克/升吲哚乙酸＋0.2毫克/升6-BA的培养基对由S-1和702诱发的两株烟草冠瘿的不同效应。左：702株诱发的冠瘿，右：S-1株诱发的冠瘿。4. 土壤根癌杆菌S-1株诱发的马铃薯畸胎瘤，示出现在冠瘿诱发初期。5. 烟草冠瘿，左：S-1株诱发的未分化的冠瘿，中：702株诱发得到未分化的冠瘿上产生的畸胎瘤，右：702株诱发的未分化的冠瘿。6. 702株诱发的未分化的冠瘿上自发产生的一系列畸胎瘤，左：弱分化型，中：莲座型，右：带茎而近于正常的类型。7. 从C-58诱发的胡萝卜冠瘿株C-58Y_3得到的再生植株。8. 从C-58诱发的胡萝卜冠瘿株C-58Y_1上得到再生植株。9. 从S-1诱发的烟草冠瘿株ps_1上得到再生植株。10. 从702株诱发的烟草冠瘿株S702上得到的再生植株。

烟草：把烟草冠瘿组织转到加2毫克/升激动素和1毫克/升吲哚乙酸的MS培养基中的办法，在诱发冠瘿后五个月，曾使*S*-1诱发的烟髓冠瘿在一个月内产生芽，转到MS基本培养基后，一部分芽十天内生了根（图Ⅰ—9），少数芽还在生芽培养基上就生了根。同一材料诱发九个月后，经二到三次诱导培养基中诱发，最后也长出几个芽，正已诱发生根。

由702株诱发的冠瘿产生畸胎瘤后，有时畸胎瘤附近会长出根来。用诱导生芽的培养基对不分化的冠瘿诱导，容易出现与畸胎瘤的芽类似的芽来。把比较正常的芽用各种生根培养基诱发，有少数芽在10—20天内能诱发出根来(图Ⅰ—10)。但另一些同源的不分化组织或芽，即使多次用诱发生芽或生根的培养基诱导，仍达不到生芽或生根的目的。

上述各种冠瘿株系，包括畸胎瘤的茎叶都已鉴定所含异常氨基酸成份，结果都含nopaline。曾对烟草的一些再生株测定，由基节能伸长的畸胎瘤诱发出产根的植株含有nopaline，但*S*-1株诱发的冠瘿分化出外形正常的十株幼小植株，鲜重800毫克，未能鉴别出nopaline。胡萝卜冠瘿原来含nopaline很少，从48株再生幼株（鲜重3克）中未鉴别出nopaline。

讨　论

上述资料仅为初步观察，尚难对某个问题作深入讨论，但却提出一些值得深入研究的问题，并为研究这些问题提供了一些材料。

冠瘿组织的稳定性

一般认为冠瘿组织是稳定的，进入植物细胞的T-DNA以不变的方式传给子细胞并表达所带信息。但Sacristan和Melchers[13]、Marton等[11]以及Scott等人[16]最近都指出有些冠瘿在诱发后，最初一段时间内冠瘿组织常含大量正常细胞生理特性不稳定或经长期培养后发生自发的形态变化。我们看到，*C*-58菌株诱发的向日葵冠瘿七个月后外形向生长特性突然发生变化及702株诱发的烟草冠瘿经155天左右出现畸胎瘤，也表明冠瘿组织是不稳定的。目前还不清楚这种改变仅仅是表型变化还是T-DNA的变化，或仅仅是正常细胞和冠瘿细胞数量比例的改变的结果。从同一菌株诱发的烟草冠瘿几乎在同时产生畸胎瘤来看，这种变化不是偶然的。

冠瘿组织生长

冠瘿生长是失控的，但它的机制还不清楚。因为它们生长不需外加植物激素，而冠瘿组织中常含较多的生长素、激动素类物质[17]，因此常用激素自养来解释。但和动物肿瘤一样，冠瘿膜脂成份[18]、膜透性与正常组织不同[19]；CAMP的变化和动物肿瘤也相似[20]，说明可能还有其它机制。这里观察到同种植物用不同菌株诱发的冠瘿在相同营养条件下生长速度不同，以及同种植物生长速度类似的冠瘿，对外源生长激素反应敏感性不同。这些材料可能有助于研究这种失控机制。

冠瘿分化

冠瘿是去分化组织，冠瘿组织诱导再生植株，是肿瘤逆转再分化的问题。逆转时T-DNA命运可能有三种：T-DNA保留，但不表达肿瘤表型；T-DNA中与肿瘤表型相

关部分掉失，但与异常氨基酸表达相关部分保留；T-DNA完全掉失[13]。目前除了用嫁接法从畸胎瘤逆转得到的烟草植株还保留一些T-DNA外[21]，用激素诱导产生的再生烟株中 T-DNA 全掉失了。我们工作很粗糙，但趋势是一致的。即从畸胎瘤来的植株含nopaline，从其它冠瘿株来的植株不含nopaline。不过，我们的冠瘿株系还未经单细胞克隆，这里得到的再生株仍然存在不是肿瘤逆转而是激素选择冠瘿组织中正常细胞进行分化的可能性，仅可作为进一步用单细胞克隆研究冠瘿组织分化的参考。

参 考 文 献

〔1〕 Zaenen, I., et al., 1974: J. Mol. Biol. 86: 109—127.
〔2〕 Drummond, M., 1979: Nature 281: 343—349.
〔3〕 Schell, J. et al., 1979: Proc. Roy. Soc. London 204: 251—266.
〔4〕 Chilton, M—D. et al.,1977: Cell 11: 263—271.
〔5〕 李英、王钧：致癌土壤杆菌K-8菌株的分离和几株致癌土壤杆菌的初步鉴定，本刊待刊。
〔6〕 Murashinge, T. & Skoog, F., 1962: Physiol. 15: 473—497.
〔7〕 Gamborg, O. L., 1968: Exp. Cell. Res. 50: 151—158.
〔8〕 Watson, B. et al.,1975: J. Bacterial. 123: 255—264.
〔9〕 Klein, R. M. & Tenenbuum, I. L., 1955: Am. J. Bot. 42: 709—712.
〔10〕 Anand, V. K. & Heberlein, G. T., 1977: Am. J. Bot. 64: 153—158.
〔11〕 Marton, L., et al., 1979: Nature 277: 129—131.
〔12〕 Sobota, A.E., 1976: Pl. Physiol. 57: 415—419.
〔13〕 Sacristan, M. D & Melchers, G., 1977: Mol. Gen. Genet. 152: 111—1177.
〔14〕 Braun, A. C., et al., 1976: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73: 496—500, 3562—3564.
〔15〕 Aerts, M., et al.,1979: Pl. Sci. Lett. 17: 43—50.
〔16〕 Scott, I. M., et al., 1980: Planta 147: 269—273.
〔17〕 Butcher, D. N., 1978: in Plant Tissue and Cell Culture (H.E.Street ed.) PP. 429—461.
〔18〕 Cocherham, L. E. & Lundeen, C. V., 1979: Pl. Physiol. 64: 543—545.
〔19〕 Lentz, C. B. et al., 1979: Planta 146: 113—117.
〔20〕 Rutheford, B. et al., Pl. Cell physiol. 17: 1111—1117.
〔21〕 Yang, F. et al., 1980: Mol. Gen. Genet, 177: 707—714.
〔22〕 Holmmgren, J. et al., 1977: Exp. Cell Res. 108: 31—39.

INDUCTION CULTURE OF PLANT CROWN GALLS AND REGENERATION OF PLANTS FROM CROWN GALLS

Wang Jun, Wan Shi-shuang and Li Ying
(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica)

ABSTRACT

Crown gall strains caused by *Agrobacterium tumefaciens S*-1 702, *C*-58 have been established from sunflower hypocotyls, tobacco stems and stem pithes, carrot roots and potato tubers. The growth of galls and the appearance of teratomas were investgated. Some crown galls strains changed properties many months after induction. A sunflower crown gall strain changed its shape and growth speed seven months after induction. The teratoma of potato tuber caused by *A. tumefaciens S*-1 appeared in the early stage of crown gall induction, but the teratomas arisen from two tobacco unorganized crown gall strains caused by *A. tumefaciens* 702 about 155 days after induction. Two tobacco crown gall strains caused by different *A. tumefaciens* strains have different response to phytohomone. Several teratoma strains with different differentiation have been obtained. The reversion of crown galls was investigated by means of induction with phytohormone. Plantlets have been induced from two carrot crown gall strains and two tobacco crown gall strains. All crown gall strains and teratomas produce nopaline. Nopaline was detected from the tobacco plantlet inducted from teratoma.